(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12) 公開特許公報（A）　(11)特許出願公開番号

特開平7－53382

(43)公開日　平成７年(1995)２月28日

(51)Int.Cl.[6]	識別記号	庁内整理番号	ＦＩ	技術表示箇所
Ａ６１Ｋ 31/557	ＡＧＺ	9454－4Ｃ		
	ＡＢＧ	9454－4Ｃ		
	ＡＢＸ	9454－4Ｃ		
Ｃ０７Ｃ 405/00	５０４　Ａ	7419－4Ｈ		

審査請求　未請求　請求項の数８　ＯＬ　（全６頁）

(21)出願番号　特願平5－199590

(22)出願日　平成５年(1993)８月11日

(71)出願人　000003001
帝人株式会社
大阪府大阪市中央区南本町１丁目６番７号

(72)発明者　遠藤　則明
東京都日野市旭が丘４丁目３番２号　帝人株式会社東京研究センター内

(72)発明者　佐藤　昌子
東京都日野市旭が丘４丁目３番２号　帝人株式会社東京研究センター内

(72)発明者　羽里　篤夫
東京都日野市旭が丘４丁目３番２号　帝人株式会社東京研究センター内

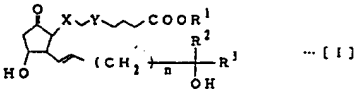
(74)代理人　弁理士　前田　純博

(54)【発明の名称】　遺伝子発現誘導剤

(57)【要約】

【目的】　粥状動脈硬化症、関節リウマチ等の血中モノサイトの病巣への集積を特徴とする疾患の予防および治療に有効な薬剤を見出す。

【構成】　下記式で表されるプロスタグランジンE$_1$誘導体を含有するＭＣＰ－１遺伝子発現誘導剤。



…［Ｉ］

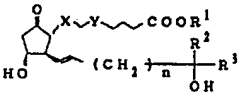
［式中、R^1は水素原子、C_1～C_{10}アルキル基または１当量のカチオンを表し、R^2は水素原子またはメチル基を表し、R^3はC_1～C_{10}アルキル基またはC_3～C_9シクロアルキル基を表す。ｎは０または１を表し、Ｘ、Ｙは－ＣＨ$_2$－を表すか、または硫黄原子を表すが、ＸＹ同時に硫黄原子であることはない。］

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】　下記式［I］

【化1】



…［I］

［式中、R^1は水素原子、C_1～C_{10}の直鎖状あるいは分岐状のアルキル基または1当量のカチオンを表す。R^2は水素原子またはメチル基を表し、R^3はC_1～C_{10}の直鎖状あるいは分岐状のアルキル基またはC_3～C_8のシクロアルキル基を表し、nは0または1を表す。X、Yは$-CH_2-$を表すかまたは硫黄原子を表すが、XY同時に硫黄原子であることはない。］で表されるプロスタグランジンE_1類及び／またはその薬理学的に許容される塩を活性成分として含有するモノサイト遊走因子遺伝子発現誘導剤。

【請求項2】　モノサイト遊走因子がMCP－1／MCAFである請求項1記載のモノサイト遊走因子遺伝子発現誘導剤。

【請求項3】　上記式［I］においてR^1が水素原子またはメチル基である請求項1または2記載のモノサイト遊走因子遺伝子発現誘導剤。

【請求項4】　上記式［I］においてR^2が水素原子である請求項1から3のいずれかに記載のモノサイト遊走因子遺伝子発現誘導剤。

【請求項5】　上記式［I］においてnが0であり、R^3がペンチル基または2－メチルヘキシル基である請求項1から4のいずれかに記載のモノサイト遊走因子遺伝子発現誘導剤。

【請求項6】　上記式［I］においてR^2が結合している炭素が不斉炭素であって、その絶対配置がS配置である請求項1から5のいずれかに記載のモノサイト遊走因子遺伝子発現誘導剤。

【請求項7】　上記式［I］においてR^2がメチル基である請求項1から3のいずれかに記載のモノサイト遊走因子遺伝子発現誘導剤。

【請求項8】　上記式［I］においてnが1でありR^3がブチル基である請求項1から4、または7のいずれかに記載のモノサイト遊走因子遺伝子発現誘導剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、遺伝子発現誘導剤に関する。さらに詳しくはプロスタグランジンE_1類を活性成分として含有するモノサイト遊走因子遺伝子発現誘導剤に関する。

【0002】

【従来の技術】プロスタグランジン類は、血小板凝集抑制作用、血管拡張性血圧降下作用、胃酸分泌抑制作用、

2

平滑筋収縮作用、細胞保護作用、利尿作用等多彩な生理作用を有しており、心筋梗塞、狭心症、動脈硬化、高血圧症、十二指腸潰瘍、分娩誘発、中絶等の治療または予防に有用な化合物である。なかでもプロスタグランジンE_1は強力な血小板凝集抑制作用、血管拡張作用を有しており、すでに臨床において用いられている。

【0003】本明細書で開示された化合物のうち7－チアプロスタグランジンE_1類は本出願人がすでに開示した化合物であり、血小板凝集阻害作用、降圧作用、血管拡張作用による抗血栓、抗狭心症、抗心筋梗塞、抗動脈硬化、悪性腫瘍転移防止作用を示すことが開示されている（特開昭58－110562号公報）。一方、この7－チアプロスタグランジンE_1類が糖尿病における神経症に有用性を示すことが知られている（特開昭64－52721号公報）。

【0004】さらに本明細書で開示された化合物のうち、5－チアプロスタグランジンE_1誘導体も本出願人がすでに開示した公知化合物であり、すぐれた抗腫瘍活性を有する化合物である（特開昭61－233664号公報）。

【0005】一方、モノサイト遊走因子、例えばMCP－1／MCAFは、Tリンパ球、マクロファージ、平滑筋細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞などより産生される、モノサイトに特異的な細胞遊走因子であり、動脈硬化巣、リウマチ関節病巣、骨形成部位あるいはメラノーマなどの悪性腫瘍等への血中モノサイトの集積を引き起こすことにより、病巣における炎症／免疫応答の進展・制御に深く関わっている因子として知られている（例えばLeonard, E.J. およびYoshimura, T.（1990）Immunology Today第11巻、97～101頁、Neiken, N.A. ら、The Journal ofClinical Investigation（1991）第88巻、1121～1127頁、Koch, A.E. ら、The Journal of Clinical Investigation（1992）第90巻、772～779頁、Hanazawa, S. ら、The Journal of Biological Chemistry（1993）第268巻、9526～9532頁、Graves, D.T. ら、American Journal of Pathology（1992）第140巻、9～14頁などを参照）。

【0006】それゆえ、その遺伝子の発現誘導剤は、動脈硬化症、関節リウマチ、変形性関節炎等の治療薬及び／または予防薬として有用であることが期待されるが、かかる遺伝子発現誘導活性を有する低分子化合物の報告はない。

【0007】また、プロスタグランジンE系化合物は種々の遺伝子の発現に影響を与えることが知られているが（例えば、Phipps, R.P. ら、Immunology Today（1991）第12巻、349～352頁、Martin, C.A. ら、Cellular Immunology（1991）第135巻、245～258頁など参照）、モノサイト遊走因子、例えばMCP－1／MCAFの遺伝子発現を誘導する活性があると

する報告はない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明が解決しようとする課題は、例えばMCP－1／MCAF等のモノサイト遊走因子遺伝子の発現を誘導する薬剤を見い出すことである。

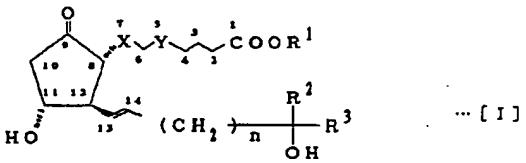
【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、プロスタグランジンE₁類またはその薬理的に許容し得る塩が、モノサイト遊走因子、例えばMCP－1／MCAFの遺伝子の発現誘導活性を有しており、モノサイトの病巣への集積が認められることのある各種疾病、例えば粥状動脈硬化症、関節リウマチ、変形性関節炎、気管支喘息、メラノーマ等の悪性腫瘍等の治療剤及び／または予防剤として有用な医薬化合物であることを見い出し、本発明を完成するに至った。

【0010】すなわち本発明は、下記式［I］

【0011】

【化2】



…［I］

【0012】［式中、R^1は水素原子、C_1～C_{10}の直鎖状あるいは分岐状のアルキル基または1当量のカチオンを表す。ここで、R^1が1当量のカチオンを表す場合には、式中－COO部分は、1の負電荷を有している。R^2は水素原子またはメチル基を表し、R^3はC_1～C_{10}の直鎖状あるいは分岐状のアルキル基またはC_3～C_7のシクロアルキル基を表し、nは0または1を表す。X、Yは－CH_2－を表すかまたは硫黄原子を表すが、XY同時に硫黄原子であることはない。］で表されるプロスタグランジンE_1類及び／またはその薬像体を活性成分として含有するモノサイト遊走因子遺伝子発現誘導剤である。

【0013】上記式［I］において、R_1は水素原子、C_1～C_{10}の直鎖状あるいは分岐状のアルキル基または1当量のカチオンを表す。C_1～C_{10}のアルキル基としては、例えばメチル、エチル、n－プロピル、iso－プロピル、n－ブチル、sec－ブチル、tert－ブチル、n－ペンチル、n－ヘキシル、n－ヘプチル、n－オクチル、n－ノニル、n－デシル基等のものをあげることができる。これらの中でも水素原子またはC_1～C_4アルキル基が好ましく、特に水素原子、メチル基が好ましい。

【0014】1当量のカチオンとしては例えば、Na^+、K^+などのアルカリ金属カチオン；1／2Ca^{2+}、1／2Mg^{2+}、1／3Al^{3+}などの2価もしくは3価の金属カチオン；アンモニウムイオン、テトラメチルアンモニウムイオンなどのアンモニウムカチオンなどが挙げられる。

【0015】上記式［I］において、R^2は水素原子またはメチル基を表す。R^2が水素原子の場合はnは0であることが好ましく、またR^2がメチル基の場合はnは1であることが好ましい。

【0016】上記式［I］において、R^3がC_1～C_{10}の直鎖状あるいは分岐状のアルキル基を表す場合としては、例えばメチル、エチル、n－プロピル、iso－プロピル、n－ブチル、sec－ブチル、tert－ブチル、n－ペンチル、n－ヘキシル、n－ヘプチル、n－オクチル、n－ノニル、n－デシル、1－メチルペンチル、1－メチルヘキシル、1，1－ジメチルペンチル、2－メチルペンチル、2－メチルヘキシル、5－メチルヘキシル、2，5－ジメチルヘキシル基等のものをあげることができる。これらの中でもC_3～C_8アルキル基が好ましく、特にn－ブチル、n－ペンチル、n－ヘキシル、（2R）－2－メチルヘキシル、（2S）－2－メチルヘキシルあるいは2－メチルヘキシル基が好ましい。

【0017】R^3がC_3～C_6のシクロアルキル基を表す場合には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル基等が挙げられ、なかでもシクロペンチル、シクロヘキシル基が好ましく挙げられる。

【0018】上記式［I］においてnが0で、15位の炭素が不斉炭素である場合には、その立体配置はS配置が好ましく、またnが1で、16位の炭素が不斉炭素である場合には、その立体配置はS配置、R配置いずれでもよいが、より好ましくはS配置である。

【0019】また、上記式［I］における13位の炭素と14位の炭素間の二重結合に関しての立体配置は、E配置である。

【0020】上記式［I］で表されるプロスタグランジンE_1類の8位、11位、12位の立体配置は天然のプロスタグランジンE_1と同一である。本発明に係るプロスタグランジンE_1類はこうした立体配置であるもの、またはその鏡像体、あるいはそれらの任意の割合の混合物である。もっとも、こうした立体配置をもつプロスタグランジンE_1類とジアステレオマーの関係にあるプロ

スタグランジンE$_1$類およびそれらの任意の割合の混合物もまたモノサイト遊走因子、例えばMCP－1／MCAFの遺伝子発現誘導活性がある。

【0021】本発明において用いられるプロスタグランジンE$_1$類の好ましい具体例を挙げれば、次のとおりである。

（1）　プロスタグランジンE$_1$
（2）　7－チアプロスタグランジンE$_1$
（3）　16－メチル－7－チアプロスタグランジンE$_1$
（4）　17，20－ジメチル－7－チアプロスタグランジンE$_1$
（5）　化合物（4）の（17R）体
（6）　化合物（4）の（17S）体
（7）　20－メチル－7－チアプロスタグランジンE$_1$
（8）　15－メチル－7－チアプロスタグランジンE$_1$
（9）　16，16－ジメチル－7－チアプロスタグランジンE$_1$
（10）　16，17，18，19，20－ペンタノル－15－シクロペンチル－7－チアプロスタグランジンE$_1$
（11）　16，17，18，19，20－ペンタノル－15－シクロヘキシル－7－チアプロスタグランジンE$_1$
（12）　15－デオキシ－16－ヒドロキシ－16－メチル－7－チアプロスタグランジンE$_1$
（13）　化合物（12）の（16R）体
（14）　化合物（12）の（16S）体
（15）　5－チアプロスタグランジンE$_1$
（16）　16－メチル－5－チアプロスタグランジンE$_1$
（17）　17，20－ジメチル－5－チアプロスタグランジンE$_1$
（18）　化合物（17）の（17R）体
（19）　化合物（17）の（17S）体
（20）　20－メチル－5－チアプロスタグランジンE$_1$
（21）　15－メチル－5－チアプロスタグランジンE$_1$
（22）　16，16－ジメチル－5－チアプロスタグランジンE$_1$
（23）　16，17，18，19，20－ペンタノル－15－シクロペンチル－5－チアプロスタグランジンE$_1$
（24）　16，17，18，19，20－ペンタノル－15－シクロヘキシル－5－チアプロスタグランジンE$_1$
（25）　15－デオキシ－16－ヒドロキシ－16－メチル－5－チアプロスタグランジンE$_1$
（26）　化合物（25）の（16R）体
（27）　化合物（25）の（16S）体
（28）　化合物（1）～（27）のメチルエステル体
（29）　化合物（1）～（27）のエチルエステル体
（30）　化合物（1）～（27）のtert－ブチルエステル体
（31）　化合物（1）～（27）のナトリウム塩
（32）　化合物（1）～（27）のカリウム塩
（33）　化合物（1）～（27）のマグネシウム塩
（34）　化合物（1）～（27）のアンモニウム塩

【0022】本発明に係るプロスタグランジンE$_1$類のうちプロスタグランジンE$_1$はすでに公知の化合物である。7－チアプロスタグランジンE$_1$類は本出願人が別途発明した方法により製造される。例えば、特開昭57－108065号公報、特開昭58－110562号公報等に詳細に記載されている。5－チアプロスタグランジンE$_1$類は、本出願人が別途発明した方法により製造される。例えば、特開昭58－198466号公報、特開昭59－122462号公報、特開昭61－233664号公報等に詳細に記載されている。

【0023】本発明に係るプロスタグランジンE$_1$類は、実施例において示すごとく、モノサイト遊走因子、例えばMCP－1／MCAFの遺伝子発現を誘導する活性があることが見出された。従って、こうした活性を有するプロスタグランジンE$_1$類を生体に投与すれば、Tリンパ球、マクロファージ、平滑筋細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞を含む各種細胞に作用し、その細胞におけるモノサイト遊走因子の産生を誘導することができる。その結果、当該細胞が血中モノサイトを遊走／活性化せしめる作用、ひいては局所への血中モノサイトの集積、あるいは局所における炎症／免疫応答を制御しうることとなる。また、血中モノサイト自身のMCP－1／MCAF等のモノサイト遊走因子の産生を誘導することにより、その血中モノサイトの活性化の程度、遊走能を変化させることができる。

【0024】こうしたことから、本発明のモノサイト遊走因子遺伝子発現誘導剤は、血中モノサイトの病巣への集積が認められることのある各種疾病の治療剤及び／または予防剤として用いることができる。

【0025】

【実施例】以下、実施例により、プロスタグランジンE$_1$類が、モノサイト遊走因子、例えばMCP－1／MCAFの遺伝子発現誘導剤であることを示す。もっとも、これらの実施例により本発明は何ら限定されるものではない。

【0026】

【実施例1】急性単球性白血病患者末梢血由来細胞株THP－1細胞（ATCC登録番号TIB203）を10%牛胎児血清を加えたRPMI－1640培地に

7

10^6個／mlになるように懸濁した。次にこの細胞懸濁液を、96ウエルプレートに、1ウエル当たり200μlずつ分注し、次いで各ウエルにプロスタグランジンE1溶液を最終濃度10^{-4}M、10^{-6}M、10^{-7}Mおよび10^{-8}Mになるように2μlずつ添加し、5%CO_2インキュベータにて37℃、30分間培養した。その後リポポリサッカライド（LPS、E. coli 0111：B4、CALBIOCHEM社より購入）水溶液を最終濃度1μg／mlになるように2μlずつ添加し、さらに5%CO_2インキュベータにて37℃、24時間培養した。

【0027】その後、培養細胞をピペッティングにより回収し、12，000rpm、30秒間の遠心操作にて細胞ペレットとした後、RNA抽出用試薬、RNAzol B［登録商標、コスモバイオ（株）］を用いて、P. Chomczynsk らの方法（Analytical Biochem.，第162巻、156～159，1987）に従い、RNAを抽出した。

【0028】次にThomas Lion らの方法（Analytical Biochemistry 第188巻、335～337，1990年）に準じ、DIG－dUTP［ジゴキシゲニンデオキシウリジン3リン酸、ベーリンガ・マンハイム・山之内＊

8

＊（株）製］を添加した基質を用い、cDNAを合成した後、PCR法によってヒトMCP－1mRNA由来cDNAを増幅した。なお、用いたDNAプライマーは、公知のヒトMCP－1のcDNA配列（T. Yoshimuraら、FEBS LETTERS 第244巻、487～493頁、1989年参照）に基いて作製した5′－AAAGTCTCTGCCGCCCTTCTGおよび5′－TTGGGTTTGCTTGTCCAGGTGであり、282bp長を増幅し得るものである。

【0029】増幅したサンプルをアガロースゲル電気泳動後、ナイロン膜にブロッティングし、得られたナイロン膜にアルカリフォスファターゼ標識抗DIG抗体［ベーリンガ・マンハイム・山之内（株）製］を反応させた後、化学発光基質Lumi－PPD530［ベーリンガ・マンハイム・山之内（株）製］を添加し、30分経過後、X線フイルムに20分間感光させた。それをデンシトメーターにかけ、OD650nmを測定して得られたピーク面積を、MCP－1遺伝子発現量として、表1に示した。

【0030】

【表1】

細胞培養条件	MCP－1遺伝子発現量
LPS無添加	5.3
LPS添加	9.6
LPS添加+PGE_1 10^{-5}M	41.3
LPS添加+PGE_1 10^{-6}M	46.2
LPS添加+PGE_1 10^{-7}M	44.6
LPS添加+PGE_1 10^{-8}M	43.8

【0031】表1に見るとおり、プロスタグランジンE1は、最終濃度10^{-6}M～10^{-8}Mにおいて、MCP－1遺伝子の発現を4～5倍誘導する活性を有している。

【0032】

【実施例2】プロスタグランジンE1の代わりに試験化合物1（15－デオキシ－16－ヒドロキシ－16－メチル－7－チアプロスタグランジンE1メチルエステル）を用いて実施例1と全く同様の試験を行なった結果を表2に示す。

【0033】

【表2】

細胞培養条件	MCP－1遺伝子発現量
LPS無添加	4.9
LPS添加	10.2
LPS添加+試験化合物1 10^{-5}M	43.3
LPS添加+試験化合物1 10^{-6}M	44.8
LPS添加+試験化合物1 10^{-7}M	45.7
LPS添加+試験化合物1 10^{-8}M	42.1

【0034】
【実施例3】プロスタグランジンE$_1$の代わりに、試験化合物2（（17R）－17，20－ジメチル－7－チアプロスタグランジンE$_1$メチルエステル）、試験化合物3（（16S）－15－デオキシ－16－ヒドロキシ*－16－メチル－5－チアプロスタグランジンE$_1$メチルエステル）を用いて、実施例1と全く同様の試験を行なった結果を表3に示す。

【0035】
【表3】

細胞培養条件	MCP－1遺伝子発現量
LPS無添加	3.8
LPS添加	5.7
LPS添加+試験化合物2（10^{-8}M）	22.3
LPS添加+試験化合物3（10^{-8}M）	23.8

【0036】
【実施例4】実施例1に記載した実施条件において、LPS添加をしない点のみ異なる操作を行なった結果を表4に示す。LPS非添加の場合においても、プロスタグランジンE$_1$がMCP－1遺伝子発現を誘導する活性を有することがわかる。

【0037】
【表4】

細胞培養条件	MCP－1遺伝子発現量
無添加	4.8
PGE$_1$ 添加 10^{-6}M	22.3
PGE$_1$ 添加 10^{-7}M	19.8
PGE$_1$ 添加 10^{-8}M	21.7

【0038】
【発明の効果】本発明の遺伝子発現誘導剤は、粥状動脈硬化症、関節リウマチ、変形性関節炎さらにはメラノーマ等の悪性腫瘍などの、血中モノサイトの病巣への集積が認められることのある疾患の予防、治療剤として使用することができる。

B1

Japanese Kokai Patent Application No. Hei 7[1995]-53382

Job No.: 6183-82163
Ref.: 21509-042-061
Translated from Japanese by the Ralph McElroy Translation Company
910 West Avenue, Austin, Texas 78701 USA

JAPANESE PATENT OFFICE
PATENT JOURNAL (A)
KOKAI PATENT APPLICATION NO. HEI 7[1995]-53382

Int. Cl.[6]:	A 61 K 31/557 C 07 C 405/00
Sequence Nos. for Office Use:	9454-4C 7419-4H
Filing No.:	Hei 5[1993]-199590
Filing Date:	August 11, 1993
Publication Date:	February 28, 1995
No. of Claims:	8 (Total of 6 pages; OL)
Examination Request:	Not filed

AGENT FOR INDUCING GENE EXPRESSION

Inventors:

Noriaki Endo
Teijin Tokyo Laboratories
4-3-2 Asahigaoka, Hino City
Tokyo Prefecture

Junko Sato
Teijin Tokyo Laboratories
4-3-2 Asahigaoka, Hino City
Tokyo Prefecture

Atsuo Hasato
Teijin Tokyo Laboratories
4-3-2 Asahigaoka, Hino City
Tokyo Prefecture

Applicant:

000003001
Teijin Limited
1-6-7 Minamihonmachi
Chuo Ku, Osaka, Japan

Agent: Sumihiro Maeda, patent attorney

[There are no amendments to this patent.]

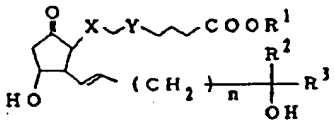
Abstract

Objective

To discover an effective drug for preventing or treating diseases that are characterized by accumulation of monocytes at lesions, such as atherosclerosis and osteoarthritis, for example.

Constitution

The MCP-1 agent for inducing gene expression containing the prostaglandin E_1 derivative expressed by the formula below:

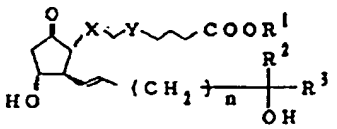


... [I]

(in the formula, R^1 is hydrogen, a straight or branched C_1-C_{10} alkyl group or 1-equivalent cation; R^2 is hydrogen or a methyl group; R^3 is a straight or branched C_1-C_{10} alkyl, or C_3-C_8 cycloalkyl group; *n* represents either 0 or 1; X and Y are either -CH_2- or a sulfur atom, but they cannot both be sulfur atoms).

Claims

1. Agent for inducing expression of the monocyte chemotactic factor gene, containing as the active ingredient the prostaglandin E_1 and/or enantiomer thereof expressed by formula (1) below:



... [I]

(in the formula, R^1 is hydrogen, a straight or branched C_1-C_{10} alkyl group or 1-equivalent cation; R^2 is hydrogen or a methyl group; R^3 is a straight or branched C_1-C_{10} alkyl, or a C_3-C_8 cycloalkyl group; *n* represents either 0 or 1; X and Y are either -CH_2- or a sulfur atom, but they cannot both be sulfur atoms).

2. The agent for inducing expression of the monocyte chemotactic factor gene according to Claim 1 above wherein the monocyte chemotactic factor is MCP-1/MCAF.

3. The agent for inducing expression of the monocyte chemotactic factor gene according to Claim 1 or 2 above wherein R^1 of formula (1) above is hydrogen or methyl.

4. The agent for inducing expression of the monocyte chemotactic factor gene according to Claims 1 through 3 above wherein R^2 of formula (1) above is hydrogen.

5. The agent for inducing expression of the monocyte chemotactic factor gene according to Claims 1 through 4 above wherein, for formula (1) above, *n* is 0 and R^3 is a pentyl group or a 2-methylhexyl group.

6. The agent for inducing expression of the monocyte chemotactic factor gene according to Claims 1 through 5 above wherein the carbon bonded to R^2 of formula (1) above is an assymmetric carbon, and the absolute configuration is S.

7. The agent for inducing expression of the monocyte chemotactic factor gene according to Claims 1 through 3 above wherein R^2 of formula (1) above is a methyl group.

8. The agent for inducing expression of the monocyte chemotactic factor gene according to Claims 1 through 4 or Claim 7 above wherein, for formula (1) above, *n* is 1 and R^3 is a butyl group.

Detailed explanation of the invention

[0001]

Industrial application field

The invention pertains to an agent for inducing gene expression. More specifically, it pertains to a agent for inducing expression of the monocyte chemotactic factor gene containing prostaglandin E_1 as the active ingredient.

[0002]

Prior art

Prostaglandins have various physiological uses such as in suppressing platelet aggregation, vasodilatory hypotensive action, inhibition of gastric acid secretion, relaxing the smooth muscle, cytoprotection, and diuretic action, for example; it is an effective compound for treating or preventing myocardial infarction, angina pectoris, arteriosclerosis, hypertension, duodenal ulcers, induction of labor, or abortion, for example. Of these, prostaglandin E_1 has a powerful platelet aggregation action and vasodilatory action, and is already in clinical use.

[0003]

Of the compounds disclosed in the detailed explanation of the invention, 7-thiaprostaglandin E_1 has already been disclosed by the applicant; it has been disclosed that this compound shows activity in preventing metastasis of malignant tumors, as well as antiarteriosclerotic, antimyocardial infarction, antiangina, and antithrombogenic activities due to its platelet aggregation inhibitory action, hypotensive action, and vasodilatory action (Japanese Kokai Patent Application No. Sho 58[1983]-110562). On the other hand, 7-thiaprostaglandin E_1 has been useful in diabetic neuropathies (Japanese Kokai Patent Application No. Sho 64[1989]-52721).

[0004]

Of the compounds disclosed in the invention, 5-thiaprostaglandin E_1 derivatives are also known compounds that have been previously disclosed by the applicant; they have excellent antitumor activity (Japanese Kokai Patent Application No. Sho 61[1986]-233664).

[0005]

On the other hand, monocyte chemotactic factors, for example MCP-1/MCAF, are produced by T-lymphocytes, macrophages, smooth muscle cells, fibroblasts, and vascular endothelial cells, for example. There is a specific chemotactic factor for monocytes, and it is known to be a factor that has a central relation to the promotion and control of the inflammation/immune response at a lesion by causing monocytes in the blood to concentrate around a malignant tumor such as a melanoma, for example, or at the site of atherosclerosis, rheumatoid arthritis, or ossification (see, for example, Loenard, E. J., and Yoshimura, T. (1990) *Immunology Today*, Vol. 11, pp. 97-101; Nelken, N.A. et al., *The Journal of Clinical Investigation* (1991), Vol. 88, pp. 1121-1127; Koch, A. E. et al., *The Journal of Clinical Investigation* (1992), Vol. 90, pp. 772-779; Hanazawa, S., et al., *The Journal of Biological Chemistry* (1993), Vol. 268, pp. 9526-9532; and Graves, D. T. et al., *American Journal of Pathology* (1992), Vol. 140, pp. 9-14).

[0006]

For this reason, it is hoped that this agent for inducing gene expression will be useful as an agent for treating and/or preventing atherosclerosis, articular rheumatism, osteoarthritis or degenerative arthritis, for example, but there are no reports of lower molecular compounds that have this property of inducing gene expression.

[0007]

It is also known that prostaglandin E-type compounds affect gene expression (see, for example, Phipps, R.P. et al., *Immunology Today* (1991), Vol. 12, pp. 349-352; or Martin, C.A., et al., *Cellular Immunology* (1991), Vol. 135, pp. 245-258); however there are no reports that monocyte chemotactic factors, such as MCP-1/MCAF, have the ability to induce gene expression.

[0008]

Problem to be solved by the present invention

The problem to be solved by the present invention is the discovery of an agent for inducing the expression of monocyte chemotactic factor genes, such as MCP-1/MCAF, for example.

[0009]

Means to solve the problem

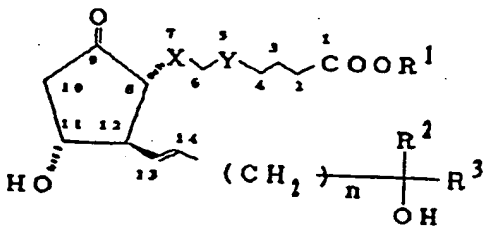
As a result of conducting a series of diligent investigations, the inventors discovered that prostaglandin E_1 or its pharmaceutically acceptable salt has the effect of inducing expression of the gene for monocyte chemotactic factors, such as MCP-1/MCAF, for example, and that it is a useful medical compound as a remedy and/or preventative for diseases in which monocytes are observed to accumulate at a lesion, such as atherosclerosis, articular rheumatism, osteoarthritis, bronchial asthma, and melanoma, for example, thereby arriving at the present invention.

[0010]

More specifically, the invention is an agent for inducing expression of the monocyte chemotactic factor gene containing as the active ingredient prostaglandin E_1 or enantiomer thereof expressed by formula (1) below:

[0011]

Structure 2



... [I]

[0012]
[In the formula, R^1 is hydrogen, a straight or branched C_1-C_{10} alkyl group or 1-equivalent cation. When R^1 is a 1-equivalent cation, the component expressed by -COO in the formula has a negative electrical charge of 1. R^2 is hydrogen or a methyl group. R^3 is a straight or branched C_1-C_{10} alkyl, or C_3-C_8 cycloalkyl group. *n* represents either 0 or 1. X and Y are either $-CH_2-$ or a sulfur atom, but they cannot both be sulfur atoms.]

[0013]
In the aforementioned formula (I), R^1 represents a hydrogen atom, a straight or branched C_1-C_{10} alkyl group or 1-equivalent cation. The C_1-C_{10} alkyl group may be methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, sec-butyl, tert-butyl, n-pentyl, n-hexyl, n-heptyl, n-octyl, n-nonyl, or n-decyl, for example. Best results are obtained when R^1 is a hydrogen atom or a C_1-C_4 alkyl group, preferably a hydrogen atom or a methyl group.

[0014]
The 1-equivalent cation may be Na^+, K^+, or other alkali metal cations; 1/2 Ca^{2+}, 1/2 Mg^{2+}, 1/3 Al^{3+}, and other [stoichimetric amounts of] bivalent or trivalent metal cations; ammonium ion, ions of tetramethyl ammonium, and cations compounds of other ammonium for example.

[0015]
In formula (1) above, R^2 represents a hydrogen atom or methyl group. When R^2 is hydrogen it is preferred that *n* be 0. When R^2 is methyl it is preferred that *n* be 1.

[0016]
When R^3 of formula (1) above represents a C_1-C_{10} straight or branched alkyl, it may be methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, sec-butyl, tert-butyl, n-pentyl, n-hexyl, n-heptyl, n-octyl, n-nonyl, n-decyl, 1-methylpentyl, 1-methylhexyl, 1,1-dimethylpentyl, 2-methypentyl, 2-methylhexyl, 5-methylhexyl, or 2,5-dimethylhexyl, for example. Best results are obtained with C_3-C_8 alkyl groups, preferably n-butyl, n-pentyl, n-hexyl, (2R)-2-methylhexyl, (2S)-2-methylhexyl, or 2-methylhexyl.

[0017]

When R^3 represents a C_3-C_8 cycloalkyl group, it may be cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, cycloheptyl, or cyclooctyl, for example. Best results are obtained with cyclopentyl and cyclohexyl.

[0018]

When *n* in formula (1) above represents 0, the carbon atom in position 15 will be assymmetric; preferably the configuration in this case is S. When *n* is 1 and the carbon in position 16 is assymmetric, the configuration may be either S or R, preferably S.

[0019]

The configuration of the double bond between the carbon atoms at positions 13 and 14 in formula (1) above is E.

[0020]

The configurations at positions 8, 11, and 12 of the prostaglandin E_1 expressed by formula (1) above are identical to natural prostaglandin E_1. The invented prostaglandin E_1 has these configurations or in the form of enantiomers thereof, or any mixture of these. Indeed, prostaglandin E_1 having this configuration, prostaglandins E_1 related to the diastereomers thereof, and any mixture thereof also have the effect of inducing expression of the gene for monocyte chemotactic factors, such as MCP-1/MCAF, for example.

[0021]

The following may be mentioned as preferred concrete examples of the prostaglandin E_1 used in the invention:

(1) prostaglandin E_1
(2) 7-thiaprostaglandin E_1
(3) 16-methyl-7-thiaprostaglandin E_1
(4) 17,20-dimethyl-7-prostaglandin E_1
(5) the (17R) form of Compound 4
(6) the (17S) form of Compound 4
(7) 20-methyl-7-thiaprostaglandin E_1
(8) 15-methyl-7-thiaprostaglandin E_1
(9) 16,16-dimethyl-7-thiaprostaglandin E_1
(10) 16,17,18,19,20-pentanol-15-cyclopentyl-7-thiaprostaglandin E_1
(11) 16,17,18,19,20-pentanol-15-cyclohexyl-7-thiaprostaglandin E_1

(12) 15-deoxy-16-hydroxy-16-methyl-7-thiaprostaglandin E_1
(13) the (16R) form of Compound 12
(14) the (16S) form of Compound 12
(15) 5-thiaprostaglandin E_1
(16) 16-methyl-5-thiaprostaglandin E_1
(17) 17,20-dimethyl-5-thiaprostaglandin E_1
(18) the (17R) form of Compound 17
(19) the (17S) form of Compound 17
(20) 20-methyl-5-thiaprostaglandin E_1
(21) 15-methyl-5-thiaprostaglandin E_1
(22) 16,16-dimethyl-5-thiaprostaglandin E_1
(23) 16,17,18,19,20-pentanol-15-cyclopentyl-5-thiaprostaglandin E_1
(24) 16,17,18,19,20-pentanol-15-cyclohexyl-5-thiaprostaglandin E_1
(25) 15-deoxy-16-hydroxy-16-methyl-5-thiaprostaglandin E_1
(26) the (16R) form of Compound 25
(27) the (16S) form of Compound 25
(28) the methyl esters of Compounds 1-27
(29) the ethyl esters of Compounds 1-27
(30) the tert-butyl esters of Compounds 1-27
(31) the sodium salts of Compounds 1-27
(32) the potassium salts of Compounds 1-27
(33) the magnesium salts of Compounds 1-27
(34) the ammonium salts of Compounds 1-27

[0022]

Of the invented prostaglandin E_1 compounds, prostaglandin E_1 is already publicly known. 7-thiaprostaglandin E_1 is manufactured by a process invented separately by the applicant. For example, a detailed description is given in Japanese Kokai Patent Application Nos. Sho 57[1982]-108065 and Sho 58[1983]-110562. 5-thiaprostaglandin E_1 may be manufactured by a process invented separately by the applicant. For example, a detailed description is given in Japanese Kokai Patent Application Nos. Sho 58[1983]-198466, Sho 59[1984]-122462 and Sho 61-233664 [1989].

[0023]

The invented prostaglandin E_1, as shown in the application examples, has been discovered to have an effect in inducing gene expression of monocyte chemotactic factors, such

as MCP-1/MCAF, for example. Accordingly, if a prostaglandin E_1 having this effect is administered to the body, it acts upon various types of cells including T-lymphocytes, macrophages, smooth muscle cells, fibroblasts, and vascular epithelial cells, so it is possible to induce the production of monocyte chemotactic factor in these cells. As a result, said cells will act with the effect of causing migration/activation of monocytes in the blood, followed by local concentration of the monocytes, or they can control the local inflammation/immune response. By inducing the production of monocyte chemotactic factors, such as MCP-1/MCAF, for example, it is possible to alter the degree of activation and chemotactic capability of monocytes.

[0024]

Therefore the invented agent for inducing expression of the monocyte chemotactic factor gene can be used as an agent for treating and/or preventing various diseases in which the aggregation of monocytes at lesions has been observed.

[0025]

The following application examples show that prostaglandin E1 is an agent for inducing expression of the gene for monocyte migration factor, such as MCP-1/MCAF, for example. The invention is not limited by these application examples in any way.

[0026]

Application Example 1

THP-1 cells (ATCC Registration Number TIB203) derived from peripheral blood of a patient with acute monocytic leukemia were suspended to 1x 10^6 cells/mL in RPMI 1640 medium to which had been added 10% fetal calf serum. This cell suspension was then poured at 200 μL/well into 96-well plates. Then 2 μL of prostaglandin E_1 solution were added to each plate to reach final concentrations of 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, and 10^{-8} M, and this was cultured for 30 min at 37°C in a 5% CO_2 incubator. Then 2-μL aliquots of lipopolysaccharide (LPS, *E. coli* 0111:B4, purchased from CalBioChem) solution were added to reach a final concentration of 1 μg/ml. This was again incubated for 24 h at 37°C in a 5% CO_2 incubator.

[0027]

The cultured cells were then recovered by pipette, centrifuged for 30 sec at 12,000 rpm and formed into cell pellets. Using the RNA extraction agent RNAzolB (registered trademark, Cosmo Bio Co. Ltd.) the RNA was extracted according to the method of P. Chomczynsk et al. (*Analytical Biochem.*, Vol. 162, pp. 156-159, 1987).

[0028]

Then, following the method of Thomas Lion *et al.* (*Analytical Biochemistry*, Vol. 188, 335-337, 1990), a substrate added DIG-dUTP (digitoxigenin dioxyuridine triphosphate, manufactured by Boeringer Mannheim Yamanouchi K.K.) was used and cDNA was synthesized. Then the cDNA derived from human MCP-1 mRNA was amplified by PCR. The DNA primers used were 5'-AAAGTCTCTGCCGCCCTTCTG and 5'-TTGGGTTTGCTTGTCCAGGTG based upon publicly known 282-bp human MCP-1 cDNA sequences (refer to T. Yoshimura et al., Febs Letters, Vol. 244, pp. 487-493, 1989).

[0029]

The amplified sample was subjected to agarose gel electrophoresis and blotted to a nylon membrane. The nylon membrane was allowed to react with alkaline phosphatase-labeled anti-DIG antibody (manufactured by Boeringer Mannheim Yamanouchi K.K.). Chemiluminescent substrate Lumi-PPD530 (manufactured by Boeringer Mannheim Yamanouchi K.K.) was added, and after 30 min this was used to expose X-ray film for 20 min. This was placed in a densitometer and measurement was taken at OD 650 nm; the resulting peak surface areas are shown in Table 1 as the amounts of MCP-1 gene expression.

[0030]

Table 1

① 細胞培養条件	MCP-1遺伝子発現量 ②
③ LPS無添加	5.3
④ LPS添加	9.6
⑤ LPS添加+PGE_1 10^{-5}M	41.3
⑥ LPS添加+PGE_1 10^{-6}M	46.2
⑦ LPS添加+PGE_1 10^{-7}M	44.6
⑧ LPS添加+PGE_1 10^{-8}M	43.8

Key: 1 Cell culturing conditions
2 Amount of MCP-1 gene expression
3 No LPS added

4 LPS added
5 LPS added + PGE_1 10^{-5} M
6 LPS added + PGE_1 10^{-6} M
7 LPS added + PGE_1 10^{-7} M
8 LPS added + PGE_1 10^{-8} M

[0031]

As shown in Table 1, at a final concentration of 10^{-5} M through 10^{-8} M, prostaglandin E_1 has the effect of inducing 4-5 times the expression of the MCP-1 gene.

[0032]

Application Example 2

An experiment identical to that of Application Example 1 was performed with the exception that Synthesis Compound 1 (15-deoxy-16-hydroxy-16-methyl-7-thiaprostaglandin E_1 methyl ester) was used instead of prostaglandin E_1. The results are shown in Table 2.

[0033]

Table 2

① 細胞培養条件	MCP－1遺伝子発現量 ②
③ LPS無添加	4．9
④ LPS添加	10．2
⑤ LPS添加＋試験化合物1 10^{-5}M	43．3
⑥ LPS添加＋試験化合物1 10^{-6}M	44．8
⑦ LPS添加＋試験化合物1 10^{-7}M	45．7
⑧ LPS添加＋試験化合物1 10^{-8}M	42．1

Key: 1 Cell culturing conditions
2 Amount of MCP-1 gene expression
3 No LPS added
4 LPS added
5 LPS added + Synthesis Compound 1 10^{-5} M
6 LPS added + Synthesis Compound 1 10^{-6} M
7 LPS added + Synthesis Compound 1 10^{-7} M

8 LPS added + Synthesis Compound 1 10^{-8} M

[0034]

Application Example 3

An experiment identical to that of Application Example 1 was performed with the exception that Synthesis Compound 2 ((17R)-17,20-dimethyl-7-thiaprostaglandin E_1 methyl ester) and Synthesis Compound 3 ((16S)-15-deoxy-16-hydroxy-16-methyl-5-thiaprostaglandin E_1 methyl ester) were used instead of prostaglandin E_1. The results are shown in Table 3.

[0035]

Table 3

細胞培養条件 (1)	MCP－1遺伝子発現量 (2)
(3) LPS無添加	3.8
(4) LPS添加	5.7
(5) LPS添加+試験化合物2 (10^{-8}M)	22.3
(6) LPS添加+試験化合物3 (10^{-8}M)	23.8

Key: 1 Cell culturing conditions
2 Amount of MCP-1 gene expression
3 No LPS added
4 LPS added
5 LPS added + Synthesis Compound 2 10^{-8} M
6 LPS added + Synthesis Compound 3 10^{-8} M

[0036]

Application Example 4

Table 4 shows the results obtained under the experimental conditions described for Application Example 1 with the exception that no LPS was added. Even when no LPS is added, it is clear that prostaglandin E_1 has the effect of inducing MCP-1 gene expression.

[0037]

Table 4

① 細胞培養条件	MCP－1遺伝子発現量 ②
③ 無添加	4.8
④ PGE_1 添加 10^{-6}M	22.3
⑤ PGE_1 添加 10^{-7}M	19.8
⑥ PGE_1 添加 10^{-8}M	21.7

Key: 1 Cell culturing conditions
2 Amount of MCP-1 gene expression
3 Nothing added
4 PGE_1 10^{-6} M
5 PGE_1 10^{-7} M
6 PGE_1 10^{-8} M

[0038]

Effect of the invention

The invented agent for inducing gene expression can be used as an agent for preventing or treating diseases in which monocytes are observed to aggregate at a lesion, such as atherosclerosis, articular rheumatism, osteoarthritis and malignant tumors such as melanoma.